

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005311

International filing date: 16 March 2005 (16.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-076931
Filing date: 17 March 2004 (17.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

16. 3. 2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 1 7 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 7 6 9 3 1
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

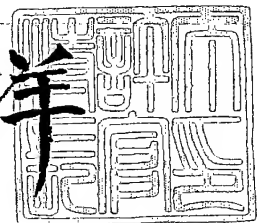
J P 2 0 0 4 - 0 7 6 9 3 1

出 願 人 株式会社ロコモジェン
Applicant(s):

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 6 1 5 7

【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0193
【提出日】 平成16年 3月17日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 48/00
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区中川 1 - 2 - 5 港北ガーデンヒルズ A棟
 5 0 3 号
 【氏名】 中島 利博
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区新石川 2 丁目 1 6 番地の 7 石川坂マンシ
 ョン 3 0 5 号
 【氏名】 山崎 聡士
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市港南区日野中央 2 - 3 9 - 9 コスモ港南台 5 0
 7 号
 【氏名】 八木下 尚子
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県川崎市麻生区東百合丘 2 - 2 0 - 6 ファイン東百合ヶ
 丘 5 2 0 3 号室
 【氏名】 佐々木 研
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県大和市桜森 2 - 4 - 1 4 レックス相模大塚駅前 2 0 5
 号
 【氏名】 加藤 幸裕
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都豊島区駒込 6 - 9 - 2 0 サンコーポ山名 1 0 2 号
 【氏名】 張 蕾
【特許出願人】
 【識別番号】 503302207
 【氏名又は名称】 株式会社ロコモジェン
【代理人】
 【識別番号】 100092783
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 浩
 【電話番号】 03-3273-2611
【選任した代理人】
 【識別番号】 100095360
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 片山 英二
【選任した代理人】
 【識別番号】 100093676
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 純子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100120134
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大森 規雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0314062

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物。

【請求項 2】

滑膜細胞の増殖を抑制する物質が、シノビオリンの発現阻害物質である請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】

シノビオリンの発現阻害物質が、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である請求項 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4】

hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質が、hsHRD3をコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である請求項 3 記載の医薬組成物。

【請求項 5】

hsHRD3をコードする遺伝子が、配列番号1に示される塩基配列を含むものである請求項 3 又は 4 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

siRNA が、配列番号1に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

リウマチ、線維症、関節炎、癌及び/又は脳神経疾患を診断又は治療するための請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。

【請求項 9】

滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病又は悪性腫瘍のアポトーシスを誘起させる方法。

【請求項 10】

滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、肺の線維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制する方法。

【請求項 11】

hsHRD3の発現の抑制が、hsHRD3とシノビオリンとを結合させるものである、請求項 8～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】hsHRD3を含む医薬組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、シノビオリンのヒトオルソログhsHRD3を含む医薬組成物、特に関節リウマチを診断又は治療するための医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチ（以下、RAという）は、関節の滑膜組織に異常な増殖が見られる全身性の慢性炎症性疾患である。本発明者は、この滑膜組織の異常増殖に必須の遺伝子としてシノビオリン遺伝子を同定している（WO 02/052007；特許文献1）。

【0003】

シノビオリンは、RA患者由来の滑膜細胞に存在する膜タンパク質であり、RING fingerモチーフを有するE3ユビキチンライゲースをコードするものである。このモチーフは、タンパク質のユビキチン化に重要な役割を果たすが、実際、自己ユビキチン化活性を有すること、P4HA1というコラーゲン合成に必須のタンパク質のユビキチン化を起こすことが証明されている（特許文献1）。また、最近では、シノビオリンが線維症、癌又は脳神経疾患の発症にも関与することが見出されている（非特許文献1）。

【0004】

シノビオリンは酵母からヒトまで高度に保存されており、出芽酵母において詳細な解析が行われている。シノビオリンの出芽酵母オルソログであるHrd1pは、Hrd3pと機能的複合体を形成し、小胞体における異常タンパク質の分解にかかわることが見出されている（非特許文献2）。しかしながら、Hrd3pに関する機能は明らかではない。

【特許文献1】国際公開第 02/052007号パンフレット

【非特許文献1】Genes Dev. 2003 Vol. 17:2436-49 [Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy].

【非特許文献2】J.B.C. 2000. Vol.151, p69-82, [Endoplasmic Reticulum Degradation Requires Lumen to Cytosol Signaling : Transmembrane Control of Hrd1p by Hrd3p]

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、滑膜細胞の異常増殖を抑制する物質を含む医薬組成物、及びhsHRD3を抑制することを特徴とする滑膜細胞の増殖を抑制する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。出芽酵母のhrd3破壊株において、Hrd1pタンパク質が不安定かつ減少しており、基質が生理学的に安定化かつ増加していることが報告されていることから、ヒトHrd3pオルソログ（以下、「hsHRD3」という）も、シノビオリンと同様に滑膜組織の異常増殖に必須であり、hsHRD3を用いて、新たなリウマチ、線維症、関節症、癌及び脳神経疾患等の診断法及び治療法の開発に有効であると考え、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物。

【0008】

滑膜細胞の増殖を抑制する物質としては、例えばシノビオリンの発現阻害物質が挙げられる。シノビオリンの発現阻害物質は、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質、好ましくは、hsHRD3をコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNAを例示することができる。hsHRD3をコードする遺伝子は、具体的には配列番号1に示される塩基配列を含むもの

である。さらに、siRNAは、配列番号1に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものであってもよい。

【0009】

本発明の医薬組成物は、リウマチ、線維症、関節炎、癌及び/又は脳神経疾患を診断又は治療するために使用される。

(2) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。

(3) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病又は悪性腫瘍におけるアポトーシスを誘起させる方法。

(4) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、肺の線維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制する方法。

【0010】

上記(2)～(4)記載の方法において、滑膜細胞のhsHRD3の発現抑制は、例えばhsHRD3とシノビオリンとを結合させて複合体を形成させることにより行うことができる。

【発明の効果】

【0011】

本発明により滑膜細胞（滑膜組織を含む）の異常増殖を抑制する物質を含む医薬組成物が提供される。この物質は、滑膜組織又は滑膜細胞の異常増殖を抑制することができるため、リウマチ、線維症、関節症、癌及び/又は脳神経疾患の診断用又は治療用医薬組成物として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

本発明は、hsHRD3の発現を抑制し、滑膜細胞の異常増殖を抑制する物質を含む、リウマチ等の疾患の診断、治療に有効な医薬組成物に関する。

【0014】

シノビオリンは酵母からヒトまで高度に保存されており、出芽酵母において詳細な解析が行われている。シノビオリンの出芽酵母オルソログであるHrd1p はHrd3p と機能的な複合体を形成し、小胞体における異常タンパク質の分解に関与することが見出されている。出芽酵母のhrd3 破壊株ではHrd1p の不安定化と減少が観察され、生理学的な基質の安定化と増加が報告されている。このことは、ヒトHrd3p オルソログ (hsHRD3) もシノビオリンと同様に、滑膜組織の異常増殖に必須であり、新たな関節症の診断、および治療法の開発に有効であることを示している。

【0015】

そこで、本発明において、まず出芽酵母Hrd3p のアミノ酸配列を用いてホモロジー検索をした結果、SEL1L という既知の遺伝子が見出された。Hrd3pとSEL1Lとの間においてアミノ酸配列の相同性は30%、類似性は45%であり、いずれも高くはないが、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されている。従って、SEL1LはHrd3pのオルソログであると決定した(図1)。次に2本鎖RNA (siRNA) を用いて滑膜細胞を処理すると、hsHRD3 の発現を抑制できることを確認した(図2)。この条件下においては、滑膜細胞の細胞増殖活性は顕著に減少していた(図3)。また約30%の細胞がアポトーシスを起こしていた(図4、5)。

【0016】

出芽酵母においてHrd3p はHrd1p の安定化に必須である。そこでシノビオリントタンパク質をWestern Blotting で検出したところ、シノビオリントタンパク質は、hsHRD3 抑制下において著しく減少していた(図6)。またシノビオリンの発現が抑制されると、コラーゲン産生量も減少する。そこで、細胞内のコラーゲン量を測定したところ、これもコントロールに比べて減少していた(図7)。さらに、hsHRD3 はシノビオリンと細胞内で複合体を形成し(図8)、共に小胞体に局在した(図9)。

【0017】

以上の結果は、hsHRD3 をターゲットとするアプローチは、RA をはじめとする関節炎、線維症、癌及び脳神経疾患の新たな診断及び治療法の開発に有効であることを示している。特にSEL1L/hsHRD3 の発現や機能のコントロールを介して、シノビオリンの発現や機能を制御するという作用機序に基づいた薬剤の開発に有用である。

1. 滑膜細胞の増殖抑制

本発明において、「滑膜細胞」とはリウマチ患者の関節部位において異常増殖している一連の細胞群を意味し、滑膜組織も包含する。

【0018】

本発明において、「hsHRD3」とは、酵母のシノビオリンであるHrd1pと結合して機能的複合体を形成し、小胞体の異常なタンパク質の分解に携わっている「Hrd3p」と呼ばれるタンパク質のヒトオルソログをいう。シノビオリンは、酵母からヒトまで高度に保存されており、特に出芽酵母において詳細な解析が行われている。この出芽酵母のオルソログであるHrd3pとアミノ酸のホモロジーが相同性で30%、類似性で45%であり、特異的な繰返し構造と膜貫通ドメインが保存されているSEL1Lという遺伝子が見いだされ、これが後にhsHRD3とされた(配列番号1)。hsHRD3のアミノ酸配列を配列番号2に、Hrd3pのアミノ酸配列を配列番号3に示す。

【0019】

このhsHRD3の発現を抑制すると、滑膜細胞の増殖活性が著しく抑制される。滑膜細胞とは、通常の関節構成要素となる細胞であって、関節腔の内側の層を満たす滑液を産生する細胞である。

【0020】

シノビオリン遺伝子の発現を抑制するには、hsHRD3の発現を抑制する方法が採用される。hsHRD3の発現を抑制するには、RNAiという現象を利用することができるが、遺伝子工学技術を用いた部位特異的突然変異誘発法、アンチセンスヌクレオチド、リボザイムを用いてもよい。

【0021】

RNAiとは、dsRNA(double-strand RNA)が標的遺伝子に特異的かつ選択的に結合し、当該標的遺伝子を切断することによりその発現を効率よく阻害する現象である。例えば、dsRNAを細胞内に導入すると、そのRNAと相同配列の遺伝子の発現が抑制(ノックダウン)される。

【0022】

上記RNAiを起こさせるために、例えばシノビオリン遺伝子に対するsiRNA(small interfering RNA)又はshRNA(short hairpin RNA)を設計及び合成し、これを作用させればよい。あるいは、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制しても、シノビオリンの発現を抑制することができる。

【0023】

siRNAの設計基準は、以下の通りである。

【0024】

(a) シノビオリンをコードする遺伝子の開始コドンから100ヌクレオチド下流の領域を選択する。

【0025】

(b) 選択した領域から、AAで始まる連続する15~30塩基、好ましくは19塩基の配列を探し、その配列のGC含量が30~70%、好ましくは45~55%となるものを選択する。

【0026】

具体的には、以下の塩基配列を有するものをsiRNAとして使用することができる。

【0027】

センス鎖 : CUUGAUAUGGACCAGCUUUTT (配列番号4)

アンチセンス鎖 : AAAGCUGGUCCAUAUCAAGTT (配列番号5)

siRNAを滑膜細胞に導入するには、in vitroで合成したsiRNAをプラスミドDNAに連結し

てこれを細胞に導入する方法、2本鎖RNAをアニールする方法などを採用することができる。

【0028】

このようにsiRNAで滑膜細胞を処理して、hsHRD3の発現を抑制する。

【0029】

また、本発明は、RNAi効果をもたらすためにshRNAを使用することもできる。shRNAとは、ショートヘアピンRNA(short hairpin RNA)と呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有するRNA分子である。

【0030】

shRNAは、その一部がステムループ構造を形成するように設計することができる。例えば、ある領域の配列を配列Aとし、配列Aに対する相補鎖を配列Bとすると、配列A、スパーサー、配列Bの順でこれらの配列が一本のRNA鎖に存在するように連結し、全体で45～60塩基の長さとなるように設計する。配列Aは、標的となるhsHRD3遺伝子(配列番号1)の一部の領域の配列であり、標的領域は特に限定されるものではなく、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列Aの長さは19～25塩基、好ましくは19～21塩基である。

【0031】

滑膜細胞の増殖を測定する方法は、培養液中にalarBlueを適量添加し、数時間後の540nmを励起波長としたときの590nmの蛍光強度を測定すればよい。

【0032】

さらに、シノビオリン遺伝子又はhsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制するために、部位特異的突然変異誘発法等を使用することができる。部位特異的突然変異誘発法は当分野において周知であり、市販のキット、例えばGeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System(インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System(Mutan-K, Mutan-Super Express Km等(タカラバイオ社製))を使用することができる。

【0033】

本発明は、hsHRD3とシノビオリンが結合して形成された、小胞体に局在する複合体により、シノビオリンの発現を抑制する方法を提供する。

【0034】

hsHRD3とシノビオリンとが結合して複合体を形成すると、シノビオリンの発現が上昇する。この場合、hsHRD3とシノビオリンの複合体は小胞体に局在する。小胞体内腔における生合成途中のタンパク質は不安定であるため、種々の物理化学的ストレス(例えば虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等)に曝される。このようなストレスを小胞体ストレス(ERストレス)といい、小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つタンパク質(unfolded protein)の出現頻度を上昇させる。適切な高次構造がとれずに立体構造に異常をきたした不良又は損傷タンパク質は小胞体を出てゴルジ体に輸送されないため、そのままでは小胞体内に不良タンパク質等が蓄積されてしまう。そこで、これらのERストレスに対して、細胞はUPR及びERADと呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって、不良タンパク質等を分解し、そのような不良タンパク質が蓄積することによる小胞体のストレスを防ぐことにより、小胞体の品質管理を行い、細胞機能の恒常性を保持している。出芽酵母のhrd3破壊株においては、Hrd1pタンパク質が不安定かつ減少しており、基質が生理学的に安定化かつ増加していることが観察されているため、ヒトにおいても、シノビオリンと複合体を形成しているhsHRD3がこの品質管理機能に何らかの関与をしていると考えられる。

【0035】

つまり、hsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリンと結合するhsHRD3が減少し、その結果シノビオリンの発現も抑制されるのである。

【0036】

また、シノビオリンの発現が増加すると、ERADが亢進されることにより、ERストレスによるアポトーシスの感受性が低下し、反対に、シノビオリンの発現が抑制されると、アポトーシスの感受性が増加する。したがって、hsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリン

の機能も低下し、結果としてアポトーシスが亢進する。

【0037】

一方、コラーゲンについては、シノビオリンはP4HA1というコラーゲン合成に必須のタンパク質のユビキチン化を通じて、その酵素としての品質を保つことにより、コラーゲン合成に必須の働きをしている。シノビオリンの発現が抑制されるとP4HA1の酵素活性が低下し、コラーゲン合成が低下する。したがってhsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリンの機能も低下し、結果としてコラーゲン合成が低下する。

【0038】

したがって、hsHRD3もシノビオリンと同様に、滑膜組織の異常増殖に必須であり、hsHRD3を用いることにより、新たなリウマチ、線維症、関節症、癌および脳神経疾患の診断、および治療法を開発することができる。

2. 医薬組成物

本発明の医薬組成物の適用疾患としては、リウマチ、線維症、関節炎、癌などの細胞増殖性疾患及び/又は脳神経疾患が挙げられる。

【0039】

本発明の医薬組成物を癌の治療剤として使用する場合は、適用部位は特に限定されず、脳腫瘍、舌癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆道癌、胆嚢癌、十二指腸癌、大腸癌、肝癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、皮膚癌、各種白血病（例えば急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、成人型T細胞白血病、悪性リンパ腫）等を対象として適用される。

【0040】

上記癌は、原発巣であっても、転移したものであっても、他の疾患と併発したものであってもよい。

【0041】

脳神経系疾患としては、例えばアルツハイマー、パーキンソン病、ポリグルタミン病が挙げられる。

【0042】

本発明の滑膜組織の異常増殖を抑制する物質を有効成分として含有する医薬組成物の投与形態は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。経口投与の場合は、液剤として、または適当な剤型により投与が可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えばネブライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の場合は、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。

【0043】

本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

【0044】

また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。本発明の医薬組成物を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等から全身投与する。脳等に局所投与することもできる。本発明の医薬組成物を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。

【0045】

本発明の医薬組成物は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許容される担体や添加物を含むものであってもよい。このような担体及び添加物として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

【0046】

上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された滑膜組織の異常増殖を抑制する物質を溶剤(例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等)に溶解し、これにTween n80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

【0047】

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なる。投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.1 μ g~100mg、好ましくは1~10 μ gである。但し、上記治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。アデノウイルスの場合の投与量は1日1回あたり10⁶~10¹³個程度であり、1週~8週間隔で投与される。但し、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。siRNAを混合する場合の用量は、0.01~10 μ g/ml、好ましくは0.1~1 μ g/mlである。

【0048】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0049】

出芽酵母Hrd3pを用いたホモロジー検索

出芽酵母Hrd3p/Ylr207wpのアミノ酸配列を用いてホモロジーサーチを実行した。

【0050】

その結果、酵母Hrd3pのヒトオルソログである配列番号1に示す塩基配列によりコードされるアミノ酸配列に相当するタンパク質を同定し、SEL1L遺伝子が見出された。Hrd3pのアミノ酸配列を配列番号3に示す。Hrd3pとSEL1Lとの間においてアミノ酸配列の相同性は30%、類似性は45%であり、いずれも高くはないが、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されている。従って、SEL1LはHrd3pのオルソログであると決定した(図1)。

【実施例2】

【0051】

SEL1L/hsHRD3の発現抑制の検討

(1) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA(siRNA)でトランスフェクションし、96時間後に細胞を回収した。RNAを抽出しRT-PCRで各遺伝子の発現量を定量した。

【0052】

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を6 cm Dish 1枚につき、1 x 10⁴個の細胞を播いた。三種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し(ネガティブコントロール)の各サンプルにつきDish一枚、合計4枚播いた。培地は10% FBS(牛

胎児血清)を含み、抗生物質を含まないDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を3ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 3mlで一回洗い、同じDMEMを1.6ml加えた。

【0053】

その後トランスフェクション試薬を添加した。トランスフェクション試薬は次のように調整した。GFP、hsHRD3、シノビオリンを標的としたRNAiのために、下記配列に示したRNAオリゴ(配列番号4~9)を最終濃度が100 μ MになるようにTEに溶かした。

【0054】

hsHRD3を標的としたsiRNAのセンス鎖: CUUGAU AUGGACCAGCUUUTT (配列番号4)

hsHRD3を標的としたsiRNAのアンチセンス鎖: AAAGCUGGUCCAUAUCAAGTT (配列番号5)

GFPを標的としたsiRNAのセンス鎖: ggcuacguccaggagcgatt (配列番号6)

GFPを標的としたsiRNAのアンチセンス鎖: ugcgcuccuggacguagcctt (配列番号7)

シノビオリンを標的としたsiRNAのセンス鎖: GGUGUUCUUUGGGCAACUGAGTT (配列番号8)

シノビオリンを標的としたsiRNAのアンチセンス鎖: CUCAGUUGCCCAAGAACACCTT (配列番号9)

各遺伝子に対するRNAオリゴのセンス鎖とアンチセンス鎖を20 μ Mになるように混合した。90℃で2分間熱変性した後、37℃で1時間ゆっくり冷却することにより、両オリゴをアニーリングさせた。アニーリングした20 μ M RNAオリゴ10 μ lをOptimem 350 μ lと混合しA液を作った。次にOligofectamineTM Reagent (Invitrogen, Cat. No. 12252-011) 8 μ lをOptimem 32 μ lと混合しB液を作った。A液とB液を5分間インキュベート後、両者を混合し、さらに15分インキュベートした。この混合液400 μ lを全量、培地を交換した各Dishに加えた。その4時間後、FBSを200 μ l添加した。

【0055】

トランスフェクション試薬添加96時間後、細胞からフェノール抽出法で全RNAを抽出し、RT-PCRに用いた。RT-PCRはSUPERScriptTM One-Step RT-PCT 100 Reactions (Invitrogen Cat. No. 10928-042)を用いた。すなわち、2 x RXN mix 50 μ l、RT/Platinum 2 μ l、DEPC水 28 μ l、以下に示す増幅用プライマー3.2 μ M溶液の各セット10 μ l x 2、合計100 μ lを混合し、10 μ lずつPCRチューブに分注した。そして1 μ lのRNAをRT-PCRテンプレートとして添加してPCR反応を開始した。

【0056】

hsHRD3増幅用オリゴマー (5' → 3') : ggctgaacagggtctatg (配列番号10)

hsHRD3増幅用オリゴマー (3' → 5') : ccgctcgagttactgtgtgtgctgctgctc (配列番号11)

)

シノビオリン増幅用オリゴマー (5' → 3') : AGCTGGTGTGTTGGCTTTGAG (配列番号12)

シノビオリン増幅用オリゴマー (3' → 5') : GGGTGGCCCCTGATCCGCAG (配列番号13)

hGAPDH増幅用オリゴマー (5' → 3') : AGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA (配列番号14)

hGAPDH増幅用オリゴマー (3' → 5') : AGTCCTTCCACGATACCAAAGTTG (配列番号15)

RNAオリゴ無しは100、50、10ng、その他は100ngのRNAをテンプレートとして用いた。サイクルは、cDNA伸長反応として50℃30分94℃2分を一回、続けてPCR増幅反応として94℃30秒、50℃30秒、72℃1分を30回行い、最後に72℃5分最終伸長反応を行った後4℃で保存した。このPCR反応液に2 μ lの6xSample Bufferを加え、全量を0.8%アガロースで100ボルト30分泳動しUVイルミネーターでPCR産物を検出した。

【0057】

その結果、siRNAにより、SEIL/hsHRD3の発現が抑制された(図2)。図2において、hsHRD3のRNAiによりPCR産物の量が、10ngのオリゴ無し(ネガティブコントロール)と同じレベルに減少したことから、hsHRD3のmRNAの発現レベルが10%以下に抑制されたことが分かった。またこのときシノビオリンのmRNAは100ngのオリゴ無しやGFP RNAiと同レベルであったことからhsHRD3の発現抑制はシノビオリンの転写には影響を与えないことが分かった。

。

(2) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (siRNA) でトランスフェクションし、48時間後にalamarBlue™を添加した。さらに48時間後に細胞増殖活性を測定した。

【0058】

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を96-well plateの各wellに付き、160個の細胞を播いた。培地は10% FBS (牛胎児血清) を含み、抗生物質を含まないDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046) を100 μ l用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 100 μ lで一回洗い、同じDMEMを80 μ l加えた。その後実施例2 (1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬を20 μ lずつ、培地を交換した各wellに加えた。さらに4時間後、FBSを10 μ l添加した。トランスフェクション試薬添加48時間後に各wellに10 μ lのalamarBlue™を添加した。48時間37℃でインキュベートした後、560nmで励起したときの590nmの蛍光強度を測定した。

【0059】

その結果、SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞の増殖活性が約60%にまで抑制された(図3)。

【0060】

このことは、hsHRD3はシノビオリン同様にRA滑膜細胞の細胞増殖に重要であり、その発現抑制は細胞の増殖低下を引き起こすことを意味する。

(3) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (siRNA) でトランスフェクションし120 時間後に細胞を回収した。回収した細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、FACSでDNA含量を測定した。

【0061】

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を6 cm Dish 1枚に付き、1 x 10⁴ 個の細胞を播いた。三種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し (ネガティブコントロール) の各サンプルに付きDish一枚、合計4枚播いた。培地は10% FBS (牛胎児血清) を含み、抗生物質を含まないDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046) を3ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 3mlで一回洗い、同じDMEMを1.6ml加えた。その後実施例2 (1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬400 μ lを全量、培地を交換した各Dishに加えた。さらに4時間後、FBSを200 μ l添加した。

【0062】

トランスフェクション試薬添加120時間後、全細胞を回収し、0.5mlのPBS(-) / 0.2% TritonX-100で可溶化した後、ナイロンメッシュを通して、細胞塊を取り除いた。1mlの50 μ g/ml RNase/PBS(-)と1mlの100 μ g/mlのヨウ化プロピジウム/PBS(-)を加え、混合した後、氷中に保存した。各細胞の蛍光量をFACSCalibur (BECTON DICKINSON)で計測し、CELLQuestで解析した。

【0063】

その結果、図4に示すようにアポトーシスを起こしたと考えられるDNA含量2n以下の細胞群がhsHRD3のRNAiにより30%以上にまで増加した。またこの割合はシノビオリンに対するRNAiと同程度に高かった(図5)。このことは、hsHRD3はシノビオリン同様に滑膜細胞の増殖に必須の遺伝子であり、その発現抑制は高頻度のアポトーシスを引き起こすことを意味している。

【実施例3】

【0064】

(1) SEL1L/hsHRD3の発現抑制下におけるWestern Blottingを用いたシノビオリンの検出
RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (siRNA) でトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。総抽出液を抽出しWestern Blottingで各タンパク質を検出した。

【0065】

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を10 cm Dish 1枚につき、 9×10^4 個の細胞を播いた。三種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し（ネガティブコントロール）の各サンプルにつきDish一枚、合計4枚播いた。培地は10% FBS（牛胎児血清）を含み、抗生物質を含まないDMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046）を10ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 10mlで一回洗い、同じDMEMを9ml加えた。その後実施例2（1）と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬の3倍量1.2mlを、培地を交換した各Dishに加えた。さらに4時間後、FBSを1ml添加した。

【0066】

トランスフェクション試薬添加48時間後、全細胞を回収し、50 μ lのExtraction Buffer IV (50mM Tris-HCl pH7.5、2mM EDTA、0.1% Triton X-100、1% NP-40、500mM NaCl、1mM PMSF、0.1% Aprotinin、0.5 μ g/ml PepstatinA、1 μ g/ml Leupeptin)にResuspendした後、氷中に30分置き、14000rpm、4℃、30分遠心した。上清1 μ lをBio-Rad DC Protein Assay Reagent (Bio-Rad、Cat. No. 500-0116)を用いたタンパク質濃度測定に用い、残り45 μ lに15 μ lの4 x SDS Bufferを加え、100℃で5分加熱した。10 μ g相当の細胞抽出液を7.5%アクリルアミドゲル2枚で泳動、分離し、ニトロセルロース膜 (OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC, Schleicher & Schuell, Cat. No. 10 439196) にブロット後、5%スキムミルクで30分ブロッキングした。

【0067】

一次抗体として1000倍希釈した抗シノビオリンモノクローナル抗体 (10Da) または抗CR EB-1抗体 (Santa Cruze, Cat. No. sc-58) で30分インキュベートした。抗シノビオリンモノクローナル抗体の二次抗体には2000倍希釈したHRP-conjugated anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, Cat. No. NA931V)を、抗CREB-1抗体には3000倍希釈したHRP-conjugated anti-Rabbit IgG (Amersham Biosciences, Cat. No. NA931V)を使用し、30分インキュベートした。検出はHome-made ECL (44 μ lの90mM クマリン酸、100 μ lの250mM ルミノール、6 μ lの過酸化水素水を20mlの100mM Tris pH8.5で混合したもの)を使用した。

【0068】

その結果、シノビオリンタンパク質は、SEL1L/hsHRD3 抑制下において著しく減少していた（図6）。すなわち、hsHRD3の発現抑制はシノビオリンタンパク質の不安定化を引き起こすことが明らかになった。

(2) シノビオリンの発現抑制下におけるコラーゲン産生量の検討

RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (siRNA) でトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。総抽出液を調製し、細胞内のコラーゲン量を測定した。

【0069】

すなわち、実施例3（1）と同様な方法でトランスフェクション、細胞抽出液を調製し、30 μ g相当の抽出液をExtraction Buffer IVで100 μ lに調節した後、SIRCOL Collagen Assay Kit (QBS社 / フナコシ Cat. No. S1111)でコラーゲン量を測定した。

【0070】

その結果、hsHRD3をノックアウトした細胞はコントロール (GFP) に比べて、細胞内コラーゲン量が約70%にまで減少していた（図7）。

【0071】

すなわち、hsHRD3はシノビオリンタンパク質の安定化を通じて、コラーゲンの産生を促進しており、hsHRD3の発現を抑制することにより、シノビオリンタンパク質の量が減少し、コラーゲン産生量を低下させることができる。

【実施例4】

【0072】

SEL1L/hsHRD3とシノビオリンの細胞内における複合体の形成

HEK293細胞にSP-HA-hsHRD3BとFLAG-シノビオリンのプラスミドをトランスフェクションした。48時間後に細胞を回収し、総抽出液を調整した。抗FLAG抗体(a)、または抗HA抗体

(b)で免疫沈降し、それぞれの抗体でWestern Blottingを行った。

【0073】

すなわち、hsHRD3Bのシグナルペプチド (SP) の直後、配列番号1に示されたアミノ酸配列の26番目と27番目との間にHA tagが挿入されるようにDNA構築したプラスミド (SP-HA-hsHRD3B) をpcDNA3-vectorにCloningした。

【0074】

8×10^5 個のHEK293細胞を10cm Dish 4枚に播いた。24時間後、以下の(c)～(f)の4種類の組み合わせのプラスミドをトランスフェクションした。

【0075】

(c) $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のpCAGGS-vector

(d) $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン / pCAGGS

(e) $10 \mu\text{g}$ のpcDNA3-vectorと $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン / pCAGGS

(f) $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン/pCAGGS

トランスフェクション48時間後、細胞を回収し、 $200 \mu\text{l}$ のExtraction Buffer II (10 mM Tris-HCl pH7.5、 150 mM NaCl、 0.5% NP-40、 10 mM MgCl_2 、 10% glycerol、 5 mM EGTA、 20 mM NaF、 50 mM β -glycerophosphate、 1 mM Na_3VO_4 、 10 mM NEM (N-Ethylmaleimide)、 1 mM PMSF、 1 mM DTT、 0.1% Aprotinin、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ PepstatinA、 $1 \mu\text{g/ml}$ Leupeptin) にResuspendし、氷上で30分インキュベートした後、 14000rpm 、 4°C 、30分遠心した。タンパク質 $100 \mu\text{g}$ 相当の抽出物をExtraction Buffer IIで 1ml に調節した。このとき同時に牛血清アルブミンを最終濃度 0.5% になるように加えた。

【0076】

次に、トランスフェクション (c) (d) 由来の抽出物には 4.9mg の抗FLAG抗体 (M2、SIGMA, Cat. No. F3165) を、(e) (f) 由来の抽出物には 2.4mg の抗HA抗体 (12CA5、Roche, Cat. No. 1583816) を加え、 4°C で一晩浸透しながらインキュベートした。翌日、 50% slurryのProtein-G Sepharose Beadsを $60 \mu\text{l}$ 加え、さらに 4°C で一時間インキュベートした。このBeadsを 0.5ml のExtraction Buffer IIで二回、 0.5ml のExtraction Buffer II + 150 mM NaCl (最終濃度 300mM NaCl) で二回洗い、 $30 \mu\text{l}$ の $2 \times$ SDS Sample Bufferを加え、 100°C 、5分熱することにより、吸着したタンパク質を溶出した。実施例3(1)と同様の方法でSDS-PAGE、Western Blottingを行い、免疫沈降したタンパク質を検出した。

【0077】

その結果、SEL1L/hsHRD3 はシノビオリンと細胞内で複合体を形成していることが判明した (図8)。

(2) SEL1L/hsHRD3とシノビオリンの細胞内における共局在

HEK293細胞をSP-HA-hsHRD3BとFLAG-シノビオリンのプラスミドでトランスフェクションした。24時間後に細胞を固定し、抗HA抗体と抗シノビオリンモノクローナル抗体で免疫染色した。

【0078】

すなわち、 2000 個のHEK293細胞をChamberslideの各Chamberに播いた。24時間後、 $0.15 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $0.05 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリンでトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで30分固定し、 3% BSA / PBS(-) で一晩ブロッキングした。翌日最終濃度が $1 \text{ ng} / \mu\text{l}$ になるように 0.3% BSA / PBS(-) で希釈した抗HA抗体 (3F10、Roche, Cat.No.1867431) と 100 倍希釈した抗シノビオリンモノクローナル抗体 (10Da) で染色し、抗HA抗体は抗ラットIg FITC抗体 (DAKO, Cat.No.F0234) で、抗シノビオリン抗体は抗マウスIg TRITC抗体 (DAKO, Cat.No.R0270) で検出した。サンプルの観察、撮影は共焦点レーザーสキャン顕微鏡LSM510 (Carl Zeiss Co., Ltd.) で、画像解析はLSM510-v3.0で行った。

【0079】

その結果、SEL1L/hsHRD3とシノビオリンは小胞体に共局在した (図9)。図9において、左列はhsHRD3の局在の図 (緑色)、中央列はシノビオリンの局在の図 (赤色)、右列は

両者を重ね合わせた図（黄色）である。

【0080】

これらの結果より、hsHRD3はシノビオリンと小胞体において複合体を形成していることが判明した。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】 Hrd3pとSEL1L/hsHRD3のドメイン構造を示す図である。

【図2】 siRNAによるSEIL/hsHRD3の発現が抑制されたことを示す図である。

【図3】 SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞の増殖活性が抑制されたことを示す図である。

【図4】 SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞のアポトーシスが誘導されたことを示す図である。

【図5】 SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞へのアポトーシスが誘導されたことを示す図である。

【図6】 SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞のシノビオリンタンパク質が減少したことを示す図である。

【図7】 SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞のコラーゲン産生が抑制されたことを示す図である。

【図8】 SEIL/hsHRD3とシノビオリンが複合体を形成したことを示す図である。

【図9】 SEIL/hsHRD3とシノビオリンが小胞体に共局在することを示す図である。

【配列表フリーテキスト】

【0082】

配列番号4：DNA/RNA結合分子

配列番号5：DNA/RNA結合分子

配列番号6：DNA/RNA結合分子

配列番号7：DNA/RNA結合分子

配列番号8：DNA/RNA結合分子

配列番号9：DNA/RNA結合分子

配列番号10：合成DNA

配列番号11：合成DNA

配列番号12：合成DNA

配列番号13：合成DNA

配列番号14：合成DNA

配列番号15：合成DNA

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> Pharmaceutical composition comprising hsHRD3

<130> P03-0193

<160> 15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 7885

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (46)..(2427)

<400> 1

gcgaaggcga cagctctagg ggttggcacc ggccccgaga ggagg atg cgg gtc cgg 57
 Met Arg Val Arg
 1

ata ggg ctg acg ctg ctg ctg tgt gcg gtg ctg ctg agc ttg gcc tcg 105
 Ile Gly Leu Thr Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala Ser
 5 10 15 20

gcg tcc tcg gat gaa gaa ggc agc cag gat gaa tcc tta gat tcc aag 153
 Ala Ser Ser Asp Glu Glu Gly Ser Gln Asp Glu Ser Leu Asp Ser Lys
 25 30 35

act act ttg aca tca gat gag tca gta aag gac cat act act gca ggc 201
 Thr Thr Leu Thr Ser Asp Glu Ser Val Lys Asp His Thr Thr Ala Gly
 40 45 50

aga gta gtt gct ggt caa ata ttt ctt gat tca gaa gaa tct gaa tta 249
 Arg Val Val Ala Gly Gln Ile Phe Leu Asp Ser Glu Glu Ser Glu Leu
 55 60 65

gaa tcc tct att caa gaa gag gaa gac agc ctc aag agc caa gag ggg 297
 Glu Ser Ser Ile Gln Glu Glu Glu Asp Ser Leu Lys Ser Gln Glu Gly
 70 75 80

gaa agt gtc aca gaa gat atc agc ttt cta gag tct cca aat cca gaa 345
 Glu Ser Val Thr Glu Asp Ile Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asn Pro Glu

| 85 | 90 | 95 | 100 | |
|---|---|-----|-----|-----|
| aac aag gac tat | gaa gag cca aag aaa gta cgg aaa cca gct ttg acc | | | 393 |
| Asn Lys Asp Tyr | Glu Glu Pro Lys Lys Val Arg Lys Pro Ala Leu Thr | | | |
| | 105 | 110 | 115 | |
| gcc att gaa ggc aca gca cat ggg gag ccc tgc cac ttc cct ttt ctt | | | | 441 |
| Ala Ile Glu Gly Thr Ala His Gly Glu Pro Cys His Phe Pro Phe Leu | | | | |
| | 120 | 125 | 130 | |
| ttc cta gat aag gag tat gat gaa tgt aca tca gat ggg agg gaa gat | | | | 489 |
| Phe Leu Asp Lys Glu Tyr Asp Glu Cys Thr Ser Asp Gly Arg Glu Asp | | | | |
| | 135 | 140 | 145 | |
| ggc aga ctg tgg tgt gct aca acc tat gac tac aaa gca gat gaa aag | | | | 537 |
| Gly Arg Leu Trp Cys Ala Thr Thr Tyr Asp Tyr Lys Ala Asp Glu Lys | | | | |
| | 150 | 155 | 160 | |
| tgg ggc ttt tgt gaa act gaa gaa gag gct gct aag aga cgg cag atg | | | | 585 |
| Trp Gly Phe Cys Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ala Lys Arg Arg Gln Met | | | | |
| | 165 | 170 | 175 | 180 |
| cag gaa gca gaa atg atg tat caa act gga atg aaa atc ctt aat gga | | | | 633 |
| Gln Glu Ala Glu Met Met Tyr Gln Thr Gly Met Lys Ile Leu Asn Gly | | | | |
| | 185 | 190 | 195 | |
| agc aat aag aaa agc caa aaa aga gaa gca tat cgg tat ctc caa aag | | | | 681 |
| Ser Asn Lys Lys Ser Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Arg Tyr Leu Gln Lys | | | | |
| | 200 | 205 | 210 | |
| gca gca agc atg aac cat acc aaa gcc ctg gag aga gtg tca tat gct | | | | 729 |
| Ala Ala Ser Met Asn His Thr Lys Ala Leu Glu Arg Val Ser Tyr Ala | | | | |
| | 215 | 220 | 225 | |
| ctt tta ttt ggt gat tac ttg cca cag aat atc cag gca gcg aga gag | | | | 777 |
| Leu Leu Phe Gly Asp Tyr Leu Pro Gln Asn Ile Gln Ala Ala Arg Glu | | | | |
| | 230 | 235 | 240 | |
| atg ttt gag aag ctg act gag gaa ggc tct ccc aag gga cag act gct | | | | 825 |
| Met Phe Glu Lys Leu Thr Glu Glu Gly Ser Pro Lys Gly Gln Thr Ala | | | | |
| | 245 | 250 | 255 | 260 |
| ctt ggc ttt ctg tat gcc tct gga ctt ggt gtt aat tca agt cag gca | | | | 873 |
| Leu Gly Phe Leu Tyr Ala Ser Gly Leu Gly Val Asn Ser Ser Gln Ala | | | | |
| | 265 | 270 | 275 | |
| aag gct ctt gta tat tat aca ttt gga gct ctt ggg ggc aat cta ata | | | | 921 |
| Lys Ala Leu Val Tyr Tyr Thr Phe Gly Ala Leu Gly Gly Asn Leu Ile | | | | |
| | 280 | 285 | 290 | |

gcc cac atg gtt ttg ggt tac aga tac tgg gct ggc atc ggc gtc ctc 969
 Ala His Met Val Leu Gly Tyr Arg Tyr Trp Ala Gly Ile Gly Val Leu
 295 300 305

cag agt tgt gaa tct gcc ctg act cac tat cgt ctt gtt gcc aat cat 1017
 Gln Ser Cys Glu Ser Ala Leu Thr His Tyr Arg Leu Val Ala Asn His
 310 315 320

gtt gct agt gat atc tcg cta aca gga ggc tca gta gta cag aga ata 1065
 Val Ala Ser Asp Ile Ser Leu Thr Gly Gly Ser Val Val Gln Arg Ile
 325 330 335 340

cgg ctg cct gat gaa gtg gaa aat cca gga atg aac agt gga atg cta 1113
 Arg Leu Pro Asp Glu Val Glu Asn Pro Gly Met Asn Ser Gly Met Leu
 345 350 355

gaa gaa gat ttg att caa tat tac cag ttc cta gct gaa aaa ggt gat 1161
 Glu Glu Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Phe Leu Ala Glu Lys Gly Asp
 360 365 370

gta caa gca cag gtt ggt ctt gga caa ctg cac ctg cac gga ggg cgt 1209
 Val Gln Ala Gln Val Gly Leu Gly Gln Leu His Leu His Gly Gly Arg
 375 380 385

gga gta gaa cag aat cat cag aga gca ttt gac tac ttc aat tta gca 1257
 Gly Val Glu Gln Asn His Gln Arg Ala Phe Asp Tyr Phe Asn Leu Ala
 390 395 400

gca aat gct ggc aat tca cat gcc atg gcc ttt ttg gga aag atg tat 1305
 Ala Asn Ala Gly Asn Ser His Ala Met Ala Phe Leu Gly Lys Met Tyr
 405 410 415 420

tcg gaa gga agt gac att gta cct cag agt aat gag aca gct ctc cac 1353
 Ser Glu Gly Ser Asp Ile Val Pro Gln Ser Asn Glu Thr Ala Leu His
 425 430 435

tac ttt aag aaa gct gct gac atg ggc aac cca gtt gga cag agt ggg 1401
 Tyr Phe Lys Lys Ala Ala Asp Met Gly Asn Pro Val Gly Gln Ser Gly
 440 445 450

ctt gga atg gcc tac ctc tat ggg aga gga gtt caa gtt aat tat gat 1449
 Leu Gly Met Ala Tyr Leu Tyr Gly Arg Gly Val Gln Val Asn Tyr Asp
 455 460 465

cta gcc ctt aag tat ttc cag aaa gct gct gaa caa ggc tgg gtg gat 1497
 Leu Ala Leu Lys Tyr Phe Gln Lys Ala Ala Glu Gln Gly Trp Val Asp
 470 475 480

ggg cag cta cag ctt ggt tcc atg tac tat aat ggc att gga gtc aag 1545
 Gly Gln Leu Gln Leu Gly Ser Met Tyr Tyr Asn Gly Ile Gly Val Lys

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|------|
| 485 | 490 | 495 | 500 | |
| aga gat tat aaa cag gcc ttg aag tat ttt aat tta gct tct cag gga | | | | 1593 |
| Arg Asp Tyr Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Phe Asn Leu Ala Ser Gln Gly | | | | |
| 505 | 510 | 515 | | |
| ggc cat atc ttg gct ttc tat aac cta gct cag atg cat gcc agt ggc | | | | 1641 |
| Gly His Ile Leu Ala Phe Tyr Asn Leu Ala Gln Met His Ala Ser Gly | | | | |
| 520 | 525 | 530 | | |
| acc ggc gtg atg cga tca tgt cac act gca gtg gag ttg ttt aag aat | | | | 1689 |
| Thr Gly Val Met Arg Ser Cys His Thr Ala Val Glu Leu Phe Lys Asn | | | | |
| 535 | 540 | 545 | | |
| gta tgt gaa cga ggc cgt tgg tct gaa agg ctt atg act gcc tat aac | | | | 1737 |
| Val Cys Glu Arg Gly Arg Trp Ser Glu Arg Leu Met Thr Ala Tyr Asn | | | | |
| 550 | 555 | 560 | | |
| agc tat aaa gat ggc gat tac aat gct gca gtg atc cag tac ctc ctc | | | | 1785 |
| Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ile Gln Tyr Leu Leu | | | | |
| 565 | 570 | 575 | 580 | |
| ctg gct gaa cag ggc tat gaa gtg gca caa agc aat gca gcc ttt att | | | | 1833 |
| Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Val Ala Gln Ser Asn Ala Ala Phe Ile | | | | |
| 585 | 590 | 595 | | |
| ctt gat cag aga gaa gca agc att gta ggt gag aat gaa act tat ccc | | | | 1881 |
| Leu Asp Gln Arg Glu Ala Ser Ile Val Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Pro | | | | |
| 600 | 605 | 610 | | |
| aga gct ttg cta cat tgg aac agg gcc gcc tct caa ggc tat act gtg | | | | 1929 |
| Arg Ala Leu Leu His Trp Asn Arg Ala Ala Ser Gln Gly Tyr Thr Val | | | | |
| 615 | 620 | 625 | | |
| gct aga att aag ctc gga gac tac cat ttc tat ggg ttt ggc acc gat | | | | 1977 |
| Ala Arg Ile Lys Leu Gly Asp Tyr His Phe Tyr Gly Phe Gly Thr Asp | | | | |
| 630 | 635 | 640 | | |
| gta gat tat gaa act gca ttt att cat tac cgt ctg gct tct gag cag | | | | 2025 |
| Val Asp Tyr Glu Thr Ala Phe Ile His Tyr Arg Leu Ala Ser Glu Gln | | | | |
| 645 | 650 | 655 | 660 | |
| caa cac agt gca caa gct atg ttt aat ctg gga tat atg cat gag aaa | | | | 2073 |
| Gln His Ser Ala Gln Ala Met Phe Asn Leu Gly Tyr Met His Glu Lys | | | | |
| 665 | 670 | 675 | | |
| gga ctg ggc att aaa cag gat att cac ctt gcg aaa cgt ttt tat gac | | | | 2121 |
| Gly Leu Gly Ile Lys Gln Asp Ile His Leu Ala Lys Arg Phe Tyr Asp | | | | |
| 680 | 685 | 690 | | |

atg gca gct gaa gcc agc cca gat gca caa gtt cca gtc ttc cta gcc 2169
 Met Ala Ala Glu Ala Ser Pro Asp Ala Gln Val Pro Val Phe Leu Ala
 695 700 705

ctc tgc aaa ttg ggc gtc gtc tat ttc ttg cag tac ata cgg gaa aca 2217
 Leu Cys Lys Leu Gly Val Val Tyr Phe Leu Gln Tyr Ile Arg Glu Thr
 710 715 720

aac att cga gat atg ttc acc caa ctt gat atg gac cag ctt ttg gga 2265
 Asn Ile Arg Asp Met Phe Thr Gln Leu Asp Met Asp Gln Leu Leu Gly
 725 730 735 740

cct gag tgg gac ctt tac ctc atg acc atc att gcg ctg ctg ttg gga 2313
 Pro Glu Trp Asp Leu Tyr Leu Met Thr Ile Ile Ala Leu Leu Leu Gly
 745 750 755

aca gtc ata gct tac agg caa agg cag cac caa gac atg cct gca ccc 2361
 Thr Val Ile Ala Tyr Arg Gln Arg Gln His Gln Asp Met Pro Ala Pro
 760 765 770

agg cct cca ggg cca cgg cca gct cca ccc cag cag gag ggg cca cca 2409
 Arg Pro Pro Gly Pro Arg Pro Ala Pro Pro Gln Gln Glu Gly Pro Pro
 775 780 785

gag cag cag cca cca cag taataggcac tgggtccagc ctgatcagt 2457
 Glu Gln Gln Pro Pro Gln
 790

gacagcgaag gaagttatct gctgggaaca ctgcatcttg atttaggacc ttgatcagt 2517

ggtcacctcc cagaagaggc acggcacaag gaagcattga attcctaaag ctgcttagaa 2577

tctgatgcct ttattttcag ggataagtaa ctcttaccta aactgagctg aatgtttggt 2637

tcagtgccat atggagtaac aactttcagt ggcttttttt tttcttttct ggaaacatat 2697

gtgagacact cagagtaatg tctactgtat ccagctatct ttcttttgat ccttttggtc 2757

attatttcag tgtgcataag ttcttaatgt caaccatctt taaggatttg tgcacgaca 2817

ctaaaaactg atcagtgtta aaaaggaaaa cccagttgca agtttaaacg tgttcgaaag 2877

tctgaaaata gaacttgctt ttttaagttta aaaaaaaaaa aaagctatct tgaaaatgtt 2937

ttggaactgc gataactgag aaacttctta ccagtcacata tgcaattaaa catattcagc 2997

atatttggtta ttttaaaagg gagggttggg aggtttctta ttggtgattg tcacacggta 3057

taccatactc ctctccttca aagaatgaaa ggcccttggtta aggagttttt tgtgagcttt 3117

acttcttttg aatggaatat acttatgcaa aaccttgtga actgactcct tgcactaacg 3177
cgagtttgcc ccacctactc tgtaatttgc ttgtttgttt tgaatataac agagccttga 3237
tccagaagcc agaggatgga ctaagtggga gaaattagaa aacaaaacga actctgggtg 3297
gggtactacg atcacagaca cagacatact tttcctaaag ttgaagcatt tgttcccagg 3357
atttatttta ctttgcattt ctttttgcac aaagaacaca tcaccttcct gaattcttta 3417
aatatgaaat atcattgccca gggtatggct tacagtgact actattatca atactaaaac 3477
tcagagaatc aaagatggat taaactcagt gggtgatgaa agccaaaacc tgtttgtact 3537
gttctatact attcaggtat ctttttattt ctgatagttt tatattataa tagaaagcca 3597
gccactgctt agctatcata gtcaccattt tctcactggt aacattagga aaatcaaggc 3657
tactatgctt caggattgtc tggttaaata gtatgggaaa aaaactgaag agtttcaaca 3717
taattacaca cgtgaaataa ttacagctta aactgaattt gtatttcatt ttattgtcag 3777
atggtggtgt tcaccagcct gtatcttgtc tgagactgca ttcgtatctg agcaggtttt 3837
ctatgcctac tgatgtcagt atgtttatac taaccttcac gcttttttcc cagaatccct 3897
catctgccag aaaacttgaa aagtttattg cttgtagagt tgtactgctt tgatttttga 3957
agttggggta gtagttagaa ctagatttaa ctagtctata atgaacatga aggcttttat 4017
atatgaagtt gtataccttt ttgtgttttag agaattatgg gaaacctggt aagcaaaact 4077
ttcctcccag ataattgctt ccaaattcga agagttagtc accaagagag ccatatgtat 4137
gaaagcgtat ctgtgaaagg taggaaactt acccccccta agtgtaatgt tgcttttaggc 4197
aactcttgta aatagtgaga cttgtttggt ctcttacatg tagagatttg agtgcagttg 4257
gtacagtact ttggtgtctc caccactgtc ctttctcccc gcttcaaaat aagtgtaatc 4317
cacggtagca gccacacttc cttcagaagg aactgttata atttatttaa aagttgaaaa 4377
accaccaag atgactacca actttcattt tttttcttct gccatccacc ctcatcttcc 4437
cttttagcaag atttttatat ctaactttcc ttccctccat tgagtacgtg ctttgagaaa 4497
acatttctta aaacagtgtg tgccacctaa ggctggatgg gaaagtgcag tcttgttgtt 4557
catataaaaa acacacttct tattagttaa cccacttgcc ttttctatt gttaatgttc 4617

tgaatttcct tttcttggct tgtttctact tcattttaac cctgggtcac ttgctgccag 4677
cagtttgtga atgggtgtctt tcaaataact tagttcttat ggcttcactt aaagactgtc 4737
tcaaaaatac ttgctctctt tcttcttttt tgttcattggg acatgggtacc taagcaaata 4797
ggagttgggt ttggtttttc tcctaaaata atgctcaata cttacctaata caaatggcat 4857
ccatttgaat aaaatgacaa taactaaagc tagttaatgt cagtgcattt aaactaactc 4917
caggattcag gagttttaat gttagaattt agatttaaca gatagagtgt ggcttcattt 4977
gtccatggta gcccatctct cctaagacct tttctagtct gtcttcctgc cttcgaactt 5037
gatgacagta aaaccctgtt tagtattctc ttgtgcattt ggtttgttgg ttagccgact 5097
gtcttgaaac tattcatttt gcttctagtt ttattttaca gaggtagcat tgggtgggtt 5157
tttttttttt ttctgtctct gtgtttgaag tttcagtttc tgttttctag gtaaggctta 5217
tttttgatta gcagtcaatg gcaaagaaaa agtaaataca agatgacttc ttttcaaaat 5277
gtatggccct ttatttgcac ttttaactca gatgaattta taaattatta atcttgatac 5337
taaggatttg ttactttttt gcatattagg ttaattttta cttacatgt gagagtctta 5397
ccactaagcc attctgtctc tgtactgttg ggaagttttg gaaaccctg ccagtgatct 5457
ggtgatgatc tgatgattta tttaaagagc cgttgatgcc tccaggaaac ttaagtattt 5517
tattaatata tatataggaa ttttttttta ttttgctttg tctttctctc ctttctttta 5577
tcctcatgtt cattcttcaa accagtgttt tggaagtatg catgcaggcc tataaatgaa 5637
aaacacaatt ctttatgtgt atagcatgtg tattaatgtc taactacata cgcaaaaact 5697
tcctttacag aggttcggac taacatttca catgcacatt tcaaaacaag atgtgtcatg 5757
aaaacagccc ctttacctgc caagacaagc agggctatat ttcagtgaca gctggatatt 5817
ttgtttctga aagtgaatct cataatatat atatgtatta cacattatta tgactagaag 5877
tatgtaagaa atgatcagaa caaaagaaaa tttctatttt catgcaaata ttttcatca 5937
gtcatcactc tcaaatataa attaaaatat aacactcctg aatgcctgag gcacgatctg 5997
gattttaaat gtgtgggtatt cattgaaaag aagctctcca cccacttgggt atttcaagaa 6057
aatttaaaac gatcccaagg aaagatgatt tgtatgttaa agtgactgca caagtaaaag 6117

tccaatgttg tgtgcatgaa aaggattcct tggttatgtg cagggaatca tctcacatgc 6177
tgtttttcct atttggtttg agaaacaggc tgacactatt ctctttgatt agaaaataaa 6237
ctcataaaac tcataatggt gatataatca agatgttaac cactataaat atgtagaaga 6297
ggaagtittta aatagacctt aagctggcat tgtgaaggaa caccatggta gactcttttt 6357
ggtaatggta ttttgtatit aatgaaatgc agtataaagg ttgggtgaagt gtaataataa 6417
ttgtgtaaac aaatcctggt taatagaaga gatgtacaga atcgttttgg tactgtatct 6477
tgaaacttgt gaaataaaga ttccactttt ggttatcctg tatgctgtaa tataaccacaa 6537
ccaagcaccc tttccagaca gacttttttt aagctgaatg aatccaattt tttaatgttt 6597
tttggaattt cagaagcttc tgaaaacatt cacttgtggc aatttgaatt tatctttcat 6657
tttaaactcc tgaaattcag atttttacaa gtccaatatt gccctaggga gaacatgaat 6717
ttgctaagaa atgttatctt ttaaattctt gatatctttg tcttgaagca gccttgatat 6777
gtagtaagcg tgattcactt tagcctgatt ataatttat ttatctaaag tttgtttatg 6837
cattgccttg tcccaggaat ttttaagag gacttgcaga gacacgtacc acacagtaac 6897
atttagacta aatatgctct gagtaaagga gaaatgaaaa aatattaaat caagagtga 6957
catgtacaca aagtgcattt ggaagtgggc tacaaattta gccccagct tcccagcagg 7017
caactcaaag aggtactga ggtaaaatgt tccagctcag aagcattgga tcttggataa 7077
aaagcctaca tgatgcaaac tgtggcaact gagatgtcag atctcaagat ctcaaattgt 7137
acttgtggga gcacagtcag tgaccccaga tgacctgac tgacctaaaa gttgtggggg 7197
aagtcggatg tcagagcctt aacaccagca ggtgaccatc caacctgggg caatgcctgc 7257
ctgttcacca cttagcctct ttctggcaag tcattagaat gtcctccatc ttcatggct 7317
gcaacttgat gagctacagc ctctttccta acttccttta tgatgctagt ttaggttgg 7377
tataccagct tggaagtatg cttagattaa gttacagcag atacacaaat tagatgcaag 7437
taaaaaaat cagaatttct gtagtagaaa ctacgaaaaa taaaaaggaa agtttttact 7497
ttttgggtat ttttttacga ataagaaaaa gtgagcgta atcagttcaa aaggaggtac 7557
tgctgtgtaa tgggctttgt acgttccttc tcatgtcact tacgtcacta cttcgccatc 7617

aaattgaaca agcttttaaat tagatcctga aaattcacta tgctagtagt ttattggtag 7677
 tattatattt tgagtagaac tctgattttc cctagaggcc aaattctttt tatctgggtt 7737
 aatttctttt aaacataaca atgttaatgc tgaattgtat attaaatccc atttctaaaa 7797
 accacacaat tttttctcat gtaagttgag tggaatgtgg ttagttaact gaatttggaa 7857
 tgttcatata aataatttgt tgctgctc 7885

<210> 2
 <211> 794
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Arg Val Arg Ile Gly Leu Thr Leu Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Ser Ala Ser Ser Asp Glu Glu Gly Ser Gln Asp Glu Ser
 20 25 30

Leu Asp Ser Lys Thr Thr Leu Thr Ser Asp Glu Ser Val Lys Asp His
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Arg Val Val Ala Gly Gln Ile Phe Leu Asp Ser Glu
 50 55 60

Glu Ser Glu Leu Glu Ser Ser Ile Gln Glu Glu Glu Asp Ser Leu Lys
 65 70 75 80

Ser Gln Glu Gly Glu Ser Val Thr Glu Asp Ile Ser Phe Leu Glu Ser
 85 90 95

Pro Asn Pro Glu Asn Lys Asp Tyr Glu Glu Pro Lys Lys Val Arg Lys
 100 105 110

Pro Ala Leu Thr Ala Ile Glu Gly Thr Ala His Gly Glu Pro Cys His
 115 120 125

Phe Pro Phe Leu Phe Leu Asp Lys Glu Tyr Asp Glu Cys Thr Ser Asp

130

135

140

Gly Arg Glu Asp Gly Arg Leu Trp Cys Ala Thr Thr Tyr Asp Tyr Lys
145 150 155 160

Ala Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ala Lys
165 170 175

Arg Arg Gln Met Gln Glu Ala Glu Met Met Tyr Gln Thr Gly Met Lys
180 185 190

Ile Leu Asn Gly Ser Asn Lys Lys Ser Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Arg
195 200 205

Tyr Leu Gln Lys Ala Ala Ser Met Asn His Thr Lys Ala Leu Glu Arg
210 215 220

Val Ser Tyr Ala Leu Leu Phe Gly Asp Tyr Leu Pro Gln Asn Ile Gln
225 230 235 240

Ala Ala Arg Glu Met Phe Glu Lys Leu Thr Glu Glu Gly Ser Pro Lys
245 250 255

Gly Gln Thr Ala Leu Gly Phe Leu Tyr Ala Ser Gly Leu Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ser Gln Ala Lys Ala Leu Val Tyr Tyr Thr Phe Gly Ala Leu Gly
275 280 285

Gly Asn Leu Ile Ala His Met Val Leu Gly Tyr Arg Tyr Trp Ala Gly
290 295 300

Ile Gly Val Leu Gln Ser Cys Glu Ser Ala Leu Thr His Tyr Arg Leu
305 310 315 320

Val Ala Asn His Val Ala Ser Asp Ile Ser Leu Thr Gly Gly Ser Val
325 330 335

Val Gln Arg Ile Arg Leu Pro Asp Glu Val Glu Asn Pro Gly Met Asn
340 345 350

Ser Gly Met Leu Glu Glu Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Phe Leu Ala
355 360 365

Glu Lys Gly Asp Val Gln Ala Gln Val Gly Leu Gly Gln Leu His Leu
370 375 380

His Gly Gly Arg Gly Val Glu Gln Asn His Gln Arg Ala Phe Asp Tyr
385 390 395 400

Phe Asn Leu Ala Ala Asn Ala Gly Asn Ser His Ala Met Ala Phe Leu
405 410 415

Gly Lys Met Tyr Ser Glu Gly Ser Asp Ile Val Pro Gln Ser Asn Glu
420 425 430

Thr Ala Leu His Tyr Phe Lys Lys Ala Ala Asp Met Gly Asn Pro Val
435 440 445

Gly Gln Ser Gly Leu Gly Met Ala Tyr Leu Tyr Gly Arg Gly Val Gln
450 455 460

Val Asn Tyr Asp Leu Ala Leu Lys Tyr Phe Gln Lys Ala Ala Glu Gln
465 470 475 480

Gly Trp Val Asp Gly Gln Leu Gln Leu Gly Ser Met Tyr Tyr Asn Gly
485 490 495

Ile Gly Val Lys Arg Asp Tyr Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Phe Asn Leu
500 505 510

Ala Ser Gln Gly Gly His Ile Leu Ala Phe Tyr Asn Leu Ala Gln Met
515 520 525

His Ala Ser Gly Thr Gly Val Met Arg Ser Cys His Thr Ala Val Glu

530

535

540

Leu Phe Lys Asn Val Cys Glu Arg Gly Arg Trp Ser Glu Arg Leu Met
545 550 555 560

Thr Ala Tyr Asn Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ile
565 570 575

Gln Tyr Leu Leu Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Val Ala Gln Ser Asn
580 585 590

Ala Ala Phe Ile Leu Asp Gln Arg Glu Ala Ser Ile Val Gly Glu Asn
595 600 605

Glu Thr Tyr Pro Arg Ala Leu Leu His Trp Asn Arg Ala Ala Ser Gln
610 615 620

Gly Tyr Thr Val Ala Arg Ile Lys Leu Gly Asp Tyr His Phe Tyr Gly
625 630 635 640

Phe Gly Thr Asp Val Asp Tyr Glu Thr Ala Phe Ile His Tyr Arg Leu
645 650 655

Ala Ser Glu Gln Gln His Ser Ala Gln Ala Met Phe Asn Leu Gly Tyr
660 665 670

Met His Glu Lys Gly Leu Gly Ile Lys Gln Asp Ile His Leu Ala Lys
675 680 685

Arg Phe Tyr Asp Met Ala Ala Glu Ala Ser Pro Asp Ala Gln Val Pro
690 695 700

Val Phe Leu Ala Leu Cys Lys Leu Gly Val Val Tyr Phe Leu Gln Tyr
705 710 715 720

Ile Arg Glu Thr Asn Ile Arg Asp Met Phe Thr Gln Leu Asp Met Asp
725 730 735

Gln Leu Leu Gly Pro Glu Trp Asp Leu Tyr Leu Met Thr Ile Ile Ala
740 745 750

Leu Leu Leu Gly Thr Val Ile Ala Tyr Arg Gln Arg Gln His Gln Asp
755 760 765

Met Pro Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro Arg Pro Ala Pro Pro Gln Gln
770 775 780

Glu Gly Pro Pro Glu Gln Gln Pro Pro Gln
785 790

<210> 3
<211> 833
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3
Met Ile Thr Leu Leu Leu Tyr Leu Cys Val Ile Cys Asn Ala Ile Val
1 5 10 15

Leu Ile Arg Ala Asp Ser Ile Ala Asp Pro Trp Pro Glu Ala Arg His
20 25 30

Leu Leu Asn Thr Ile Ala Lys Ser Arg Asp Pro Met Lys Glu Ala Ala
35 40 45

Met Glu Pro Asn Ala Asp Glu Phe Val Gly Phe Tyr Val Pro Met Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Asn Glu Glu Lys Asn Tyr Gln Ser Ile Trp Gln Asn
65 70 75 80

Glu Ile Thr Asp Ser Gln Arg His Ile Tyr Glu Leu Leu Val Gln Ser
85 90 95

Ser Glu Gln Phe Asn Asn Ser Glu Ala Thr Tyr Thr Leu Ser Gln Ile
100 105 110

His Leu Trp Ser Gln Tyr Asn Phe Pro His Asn Met Thr Leu Ala His
115 120 125

Lys Tyr Leu Glu Lys Phe Asn Asp Leu Thr His Phe Thr Asn His Ser
130 135 140

Ala Ile Phe Asp Leu Ala Val Met Tyr Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ser

145 150 155 160
 Gly Asn Asp Gln Thr Val Ile Pro Gln Asp Ser Ala Lys Ala Leu Leu
 165 170 175
 Tyr Tyr Gln Arg Ala Ala Gln Leu Gly Asn Leu Lys Ala Lys Gln Val
 180 185 190
 Leu Ala Tyr Lys Tyr Tyr Ser Gly Phe Asn Val Pro Arg Asn Phe His
 195 200 205
 Lys Ser Leu Val Leu Tyr Arg Asp Ile Ala Glu Gln Leu Arg Lys Ser
 210 215 220
 Tyr Ser Arg Asp Glu Trp Asp Ile Val Phe Pro Tyr Trp Glu Ser Tyr
 225 230 235 240
 Asn Val Arg Ile Ser Asp Phe Glu Ser Gly Leu Leu Gly Lys Gly Leu
 245 250 255
 Asn Ser Val Pro Ser Ser Thr Val Arg Lys Arg Thr Thr Arg Pro Asp
 260 265 270
 Ile Gly Ser Pro Phe Ile Ala Gln Val Asn Gly Val Gln Met Thr Leu
 275 280 285
 Gln Ile Glu Pro Met Gly Arg Phe Ala Phe Asn Gly Asn Asp Gly Asn
 290 295 300
 Ile Asn Gly Asp Glu Asp Asp Glu Asp Ala Ser Glu Arg Arg Ile Ile
 305 310 315 320
 Arg Ile Tyr Tyr Ala Ala Leu Asn Asp Tyr Lys Gly Thr Tyr Ser Gln
 325 330 335
 Ser Arg Asn Cys Glu Arg Ala Lys Asn Leu Leu Glu Leu Thr Tyr Lys
 340 345 350
 Glu Phe Gln Pro His Val Asp Asn Leu Asp Pro Leu Gln Val Phe Tyr
 355 360 365
 Tyr Val Arg Cys Leu Gln Leu Leu Gly His Met Tyr Phe Thr Gly Glu
 370 375 380
 Gly Ser Ser Lys Pro Asn Ile His Met Ala Glu Glu Ile Leu Thr Thr
 385 390 395 400
 Ser Leu Glu Ile Ser Arg Arg Ala Gln Gly Pro Ile Gly Arg Ala Cys
 405 410 415

Ile Asp Leu Gly Leu Ile Asn Gln Tyr Ile Thr Asn Asn Ile Ser Gln
420 425 430

Ala Ile Ser Tyr Tyr Met Lys Ala Met Lys Thr Gln Ala Asn Asn Gly
435 440 445

Ile Val Glu Phe Gln Leu Ser Lys Leu Ala Thr Ser Phe Pro Glu Glu
450 455 460

Lys Ile Gly Asp Pro Phe Asn Leu Met Glu Thr Ala Tyr Leu Asn Gly
465 470 475 480

Phe Ile Pro Ala Ile Tyr Glu Phe Ala Val Met Ile Glu Ser Gly Met
485 490 495

Asn Ser Lys Ser Ser Val Glu Asn Thr Ala Tyr Leu Phe Lys Thr Phe
500 505 510

Val Asp Lys Asn Glu Ala Ile Met Ala Pro Lys Leu Arg Thr Ala Phe
515 520 525

Ala Ala Leu Ile Asn Asp Arg Ser Glu Val Ala Leu Trp Ala Tyr Ser
530 535 540

Gln Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Thr Ala Gln Val Ser Ala Ala Tyr
545 550 555 560

Leu Met Tyr Gln Leu Pro Tyr Glu Phe Glu Asp Pro Pro Arg Thr Thr
565 570 575

Asp Gln Arg Lys Thr Leu Ala Ile Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Phe Lys
580 585 590

Gln Gly Asn Ile Asp Ala Gly Val Val Ala Gly Asp Ile Tyr Phe Gln
595 600 605

Met Gln Asn Tyr Ser Lys Ala Met Ala Leu Tyr Gln Gly Ala Ala Leu
610 615 620

Lys Tyr Ser Ile Gln Ala Ile Trp Asn Leu Gly Tyr Met His Glu His
625 630 635 640

Gly Leu Gly Val Asn Arg Asp Phe His Leu Ala Lys Arg Tyr Tyr Asp
645 650 655

Gln Val Ser Glu His Asp His Arg Phe Tyr Leu Ala Ser Lys Leu Ser
660 665 670

Val Leu Lys Leu His Leu Lys Ser Trp Leu Thr Trp Ile Thr Arg Glu
675 680 685

Lys Val Asn Tyr Trp Lys Pro Ser Ser Pro Leu Asn Pro Asn Glu Asp
690 695 700

Thr Gln His Ser Lys Thr Ser Trp Tyr Lys Gln Leu Thr Lys Ile Leu
705 710 715 720

Gln Arg Met Arg His Lys Glu Asp Ser Asp Lys Ala Ala Glu Asp Ser
725 730 735

His Lys His Arg Thr Val Val Gln Asn Gly Ala Asn His Arg Gly Asp
740 745 750

Asp Gln Glu Glu Ala Ser Glu Ile Leu Gly Phe Gln Met Glu Asp Leu
755 760 765

Val Thr Met Gly Cys Ile Leu Gly Ile Phe Leu Leu Ser Ile Leu Met
770 775 780

Ser Thr Leu Ala Ala Arg Arg Gly Trp Asn Val Arg Phe Asn Gly Ala
785 790 795 800

Gln Leu Asn Ala Asn Gly Asn Arg Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln
805 810 815

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Gly Trp Asp Phe Asn Val Gln Ile Phe Ala
820 825 830

Ile

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 4

cuugauaugg accagcuut t

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 5
aaagcugguc caaucaagt t 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 6
ggcuacgucc aggagcgcat t 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 7
ugcgcuccug gacguagcct t 21

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 8
gguguucuuu gggcaacuga gtt 23

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 9

cucaguugcc caaagaacac ctt

23

<210> 10
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 10
ggctgaacag ggctatg

17

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 11
ccgctcgagt tactgtggtg gctgctgctc

30

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 12
agctgggtggtt tggctttgag

20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 13
gggtggcccc tgatccgcag

20

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 14
aggtgaaggt cggagtcaac gga

23

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

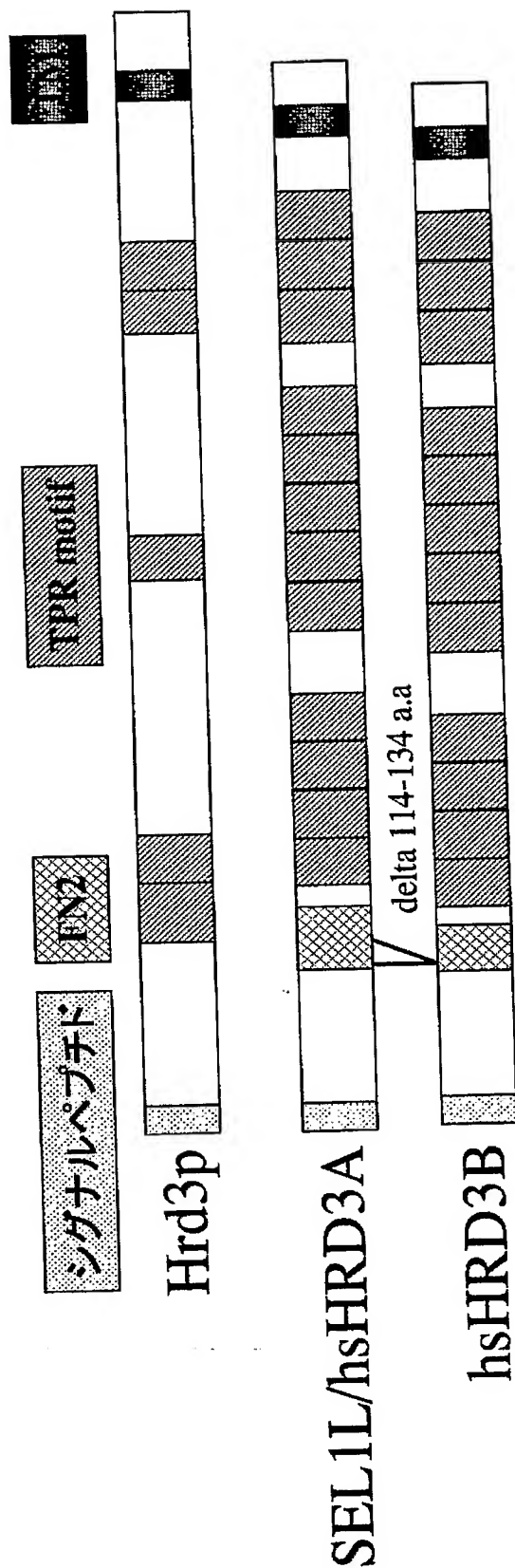
<220>
<223> synthetic DNA

<400> 15
agtccttcca cgatacctaaa gttg

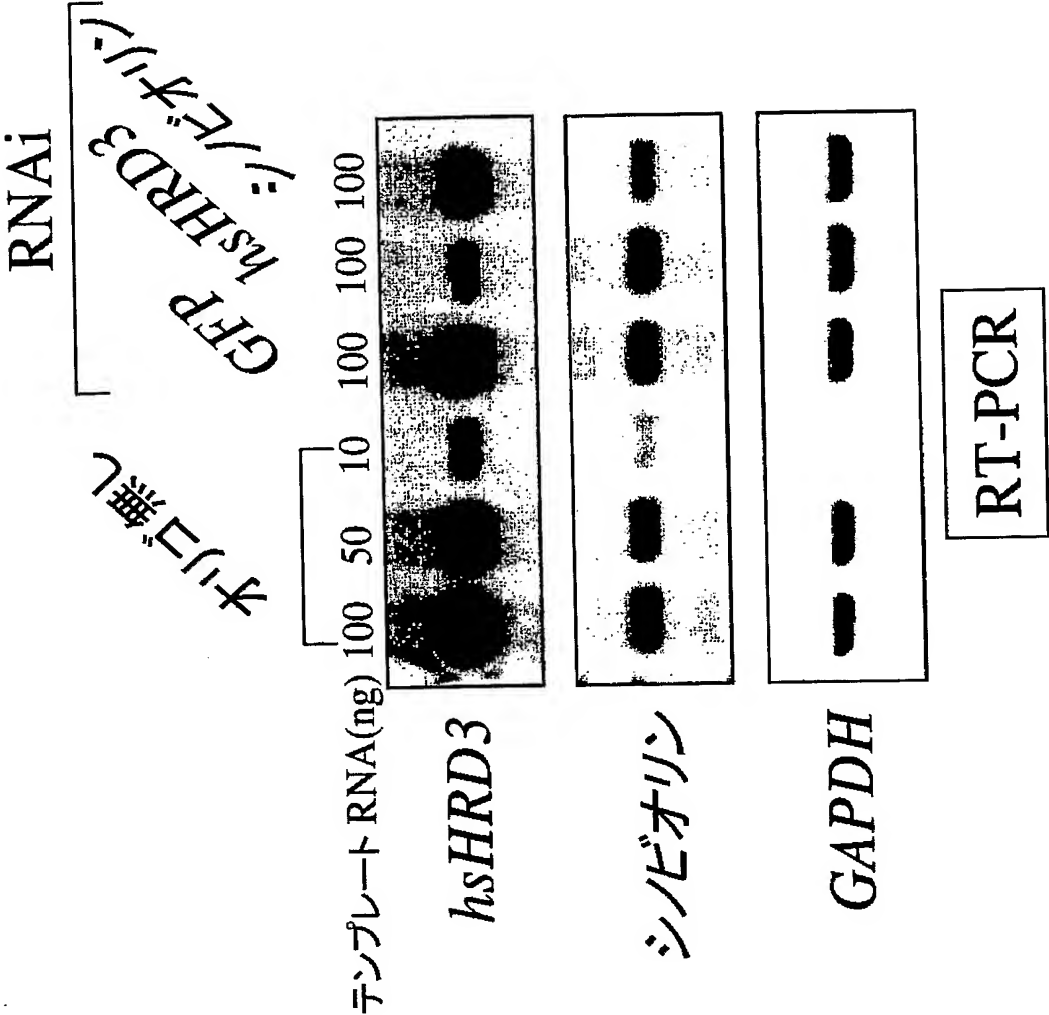
24

【書類名】 図面

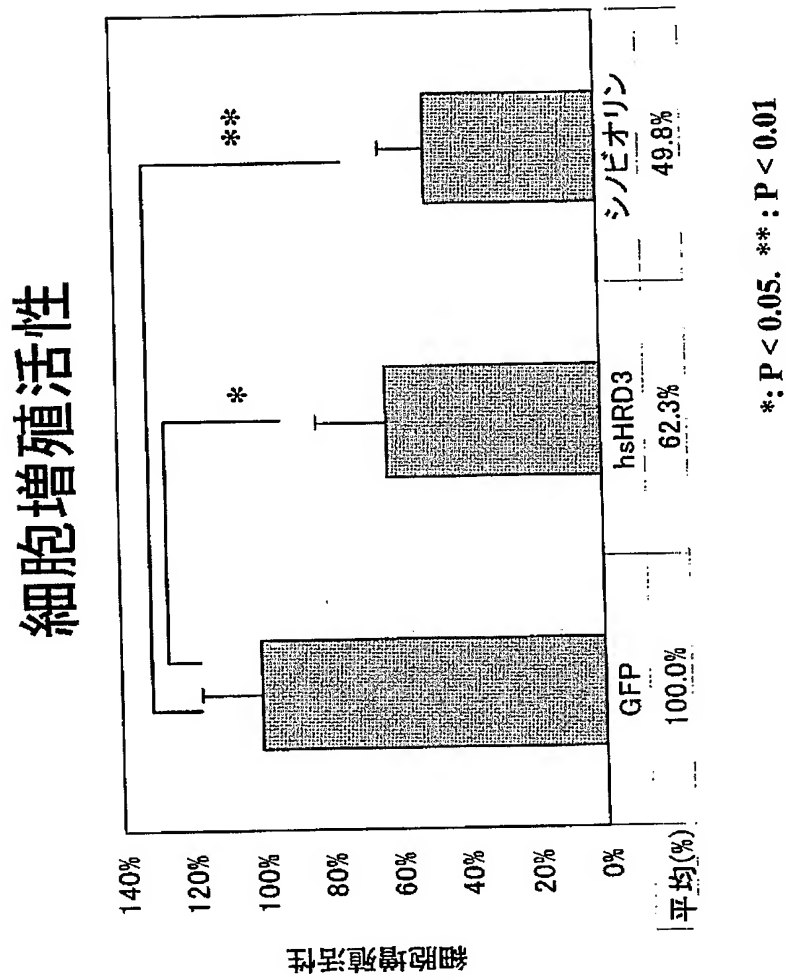
【図 1】



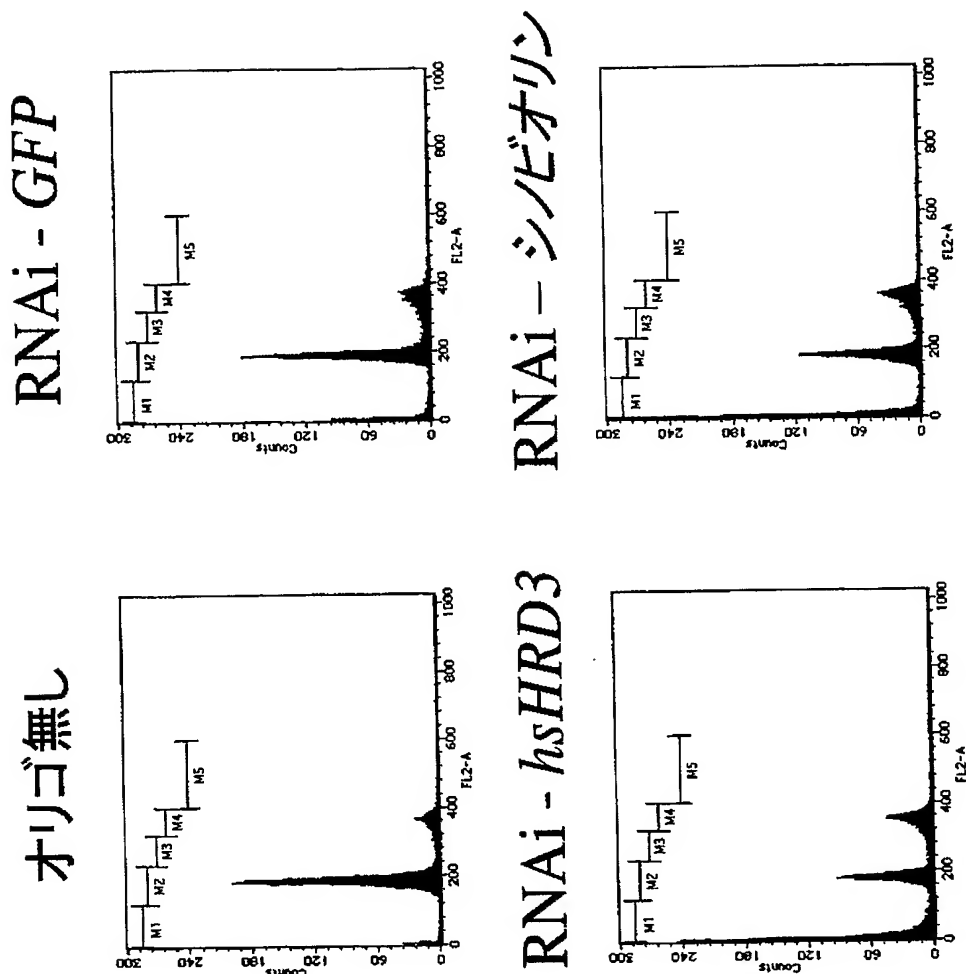
【図 2】



【図 3】

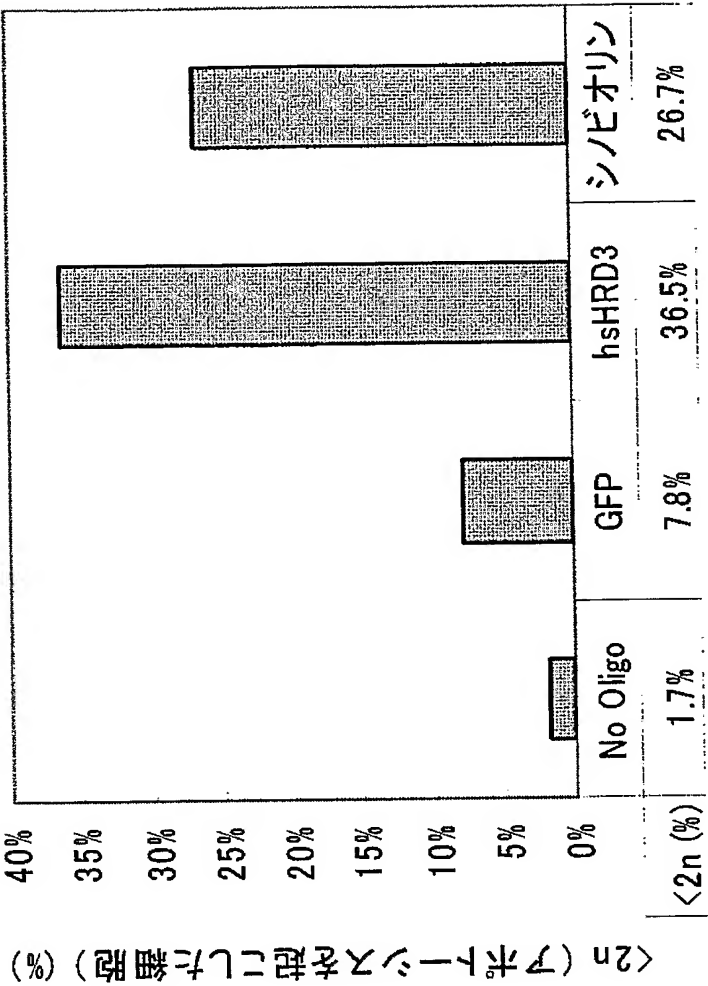


【図 4】

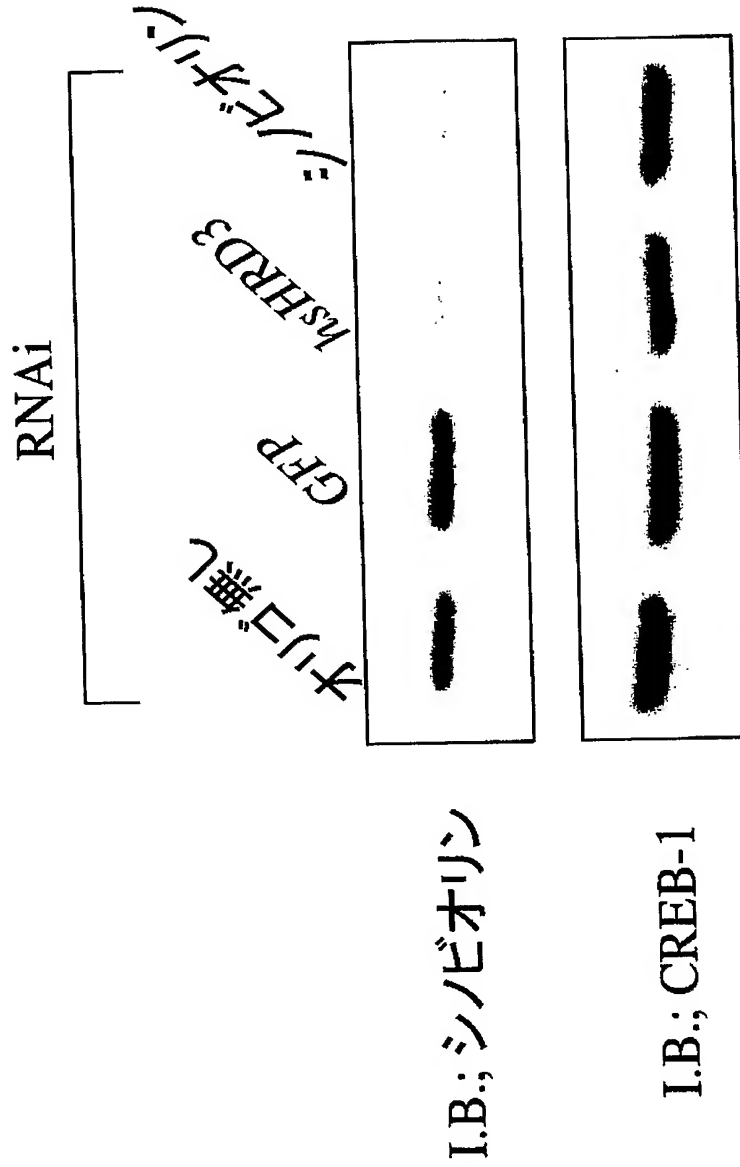


【図 5】

RNAiによるアポトーシス

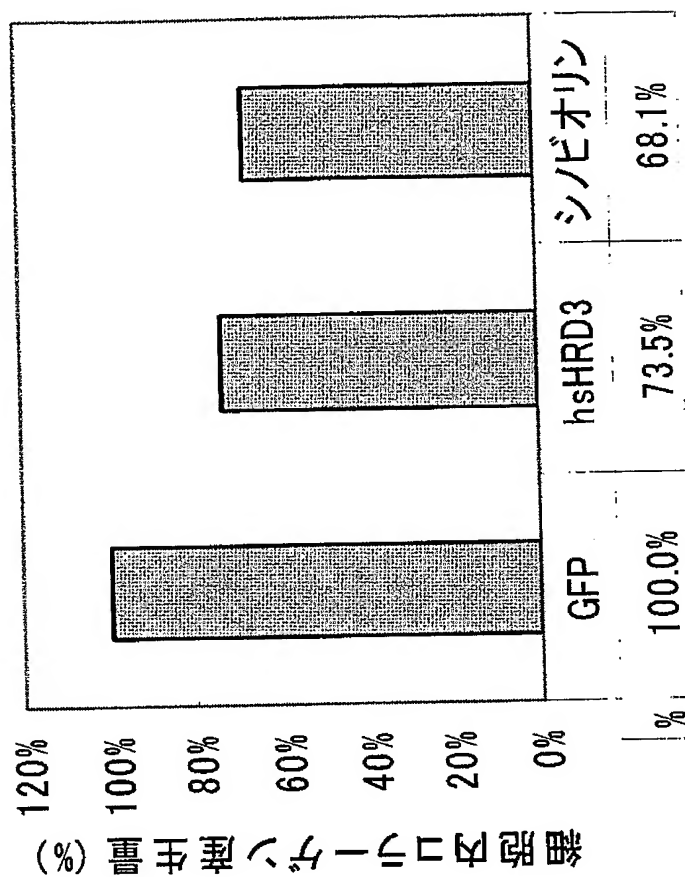


【図 6】

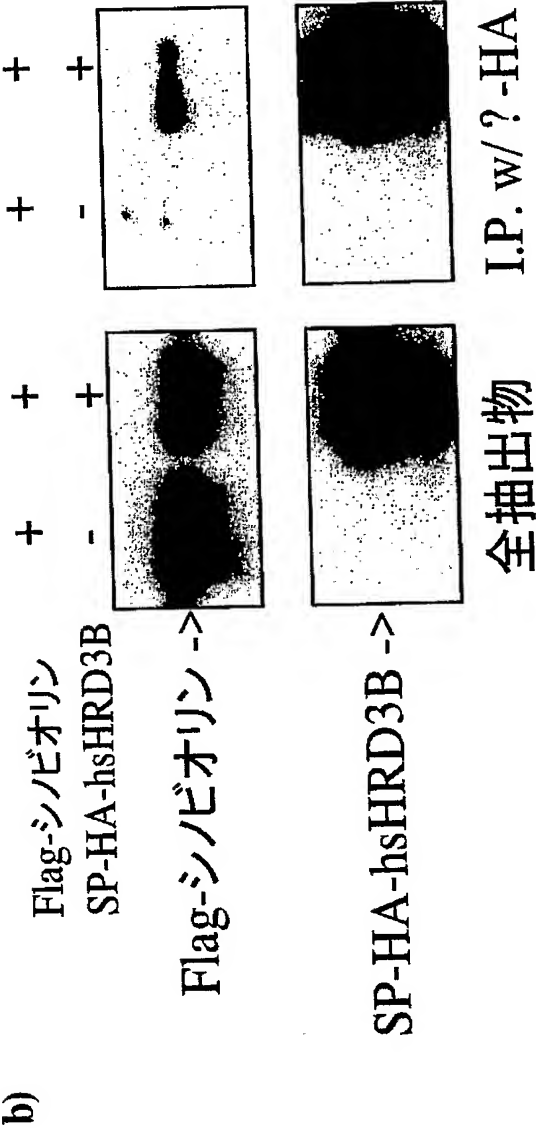
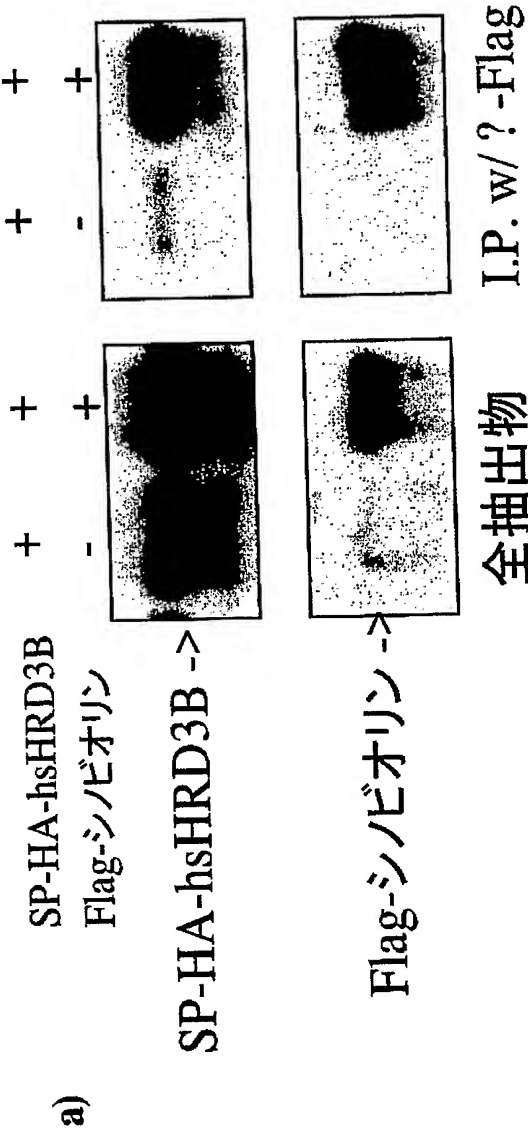


【図 7】

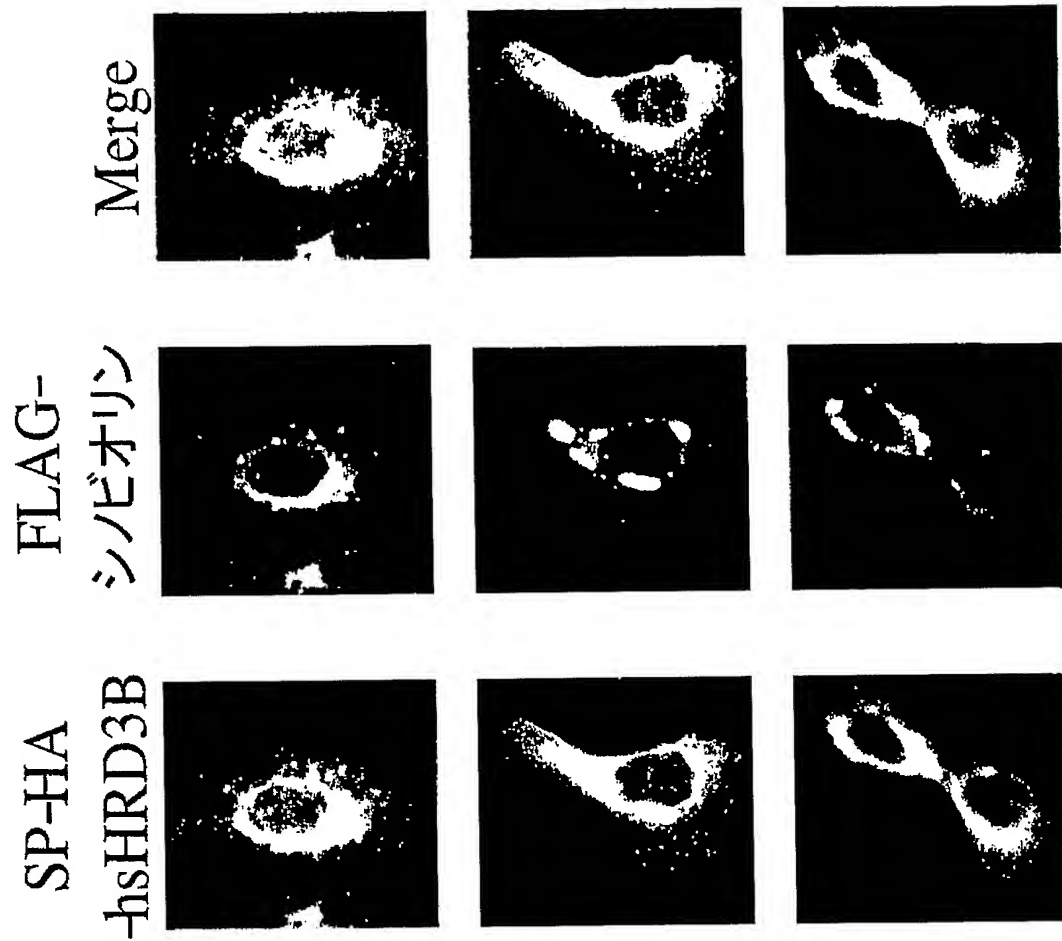
細胞内コラーゲン産生量



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 滑膜組織又は滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物の提供。

【解決手段】 リウマチ、線維症、関節炎、癌及び/又は脳神経疾患を診断又は治療するために有用な、滑膜組織又は滑膜細胞の増殖を抑制する医薬組成物、並びに滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 7 6 9 3 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 0 2 2 0 7]

1. 変更年月日 2 0 0 4 年 8 月 6 日
[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消
[統合先識別番号] 3 0 1 0 5 0 9 0 2
住 所 東京都港区虎ノ門 4 - 1 - 1 虎ノ門パストラル本館 7 階
氏 名 株式会社ロコモジェン

特願 2 0 0 4 - 0 7 6 9 3 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 0 1 0 5 0 9 0 2]

1. 変更年月日 2 0 0 4 年 8 月 6 日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館
7階
氏 名 株式会社ロコモジェン
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 8 月 6 日
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合
[統合元識別番号] 5 0 3 3 0 2 2 0 7
住 所 東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館
7階
氏 名 株式会社ロコモジェン